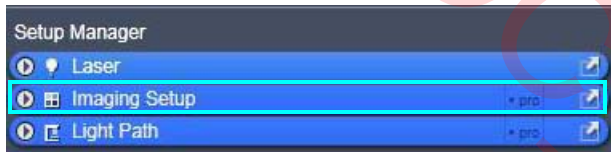
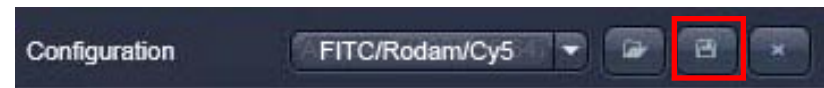


Adquisición “Fitc/Rodam/Cy5” o cualquier otro método

1º Configurar el método que vamos a usar



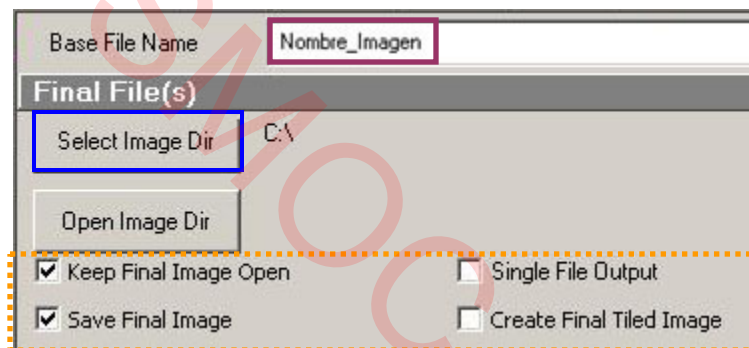
2º **Grabar** el método con la configuración seleccionada.



3º Cargar el MultiTime Series del menú **Macro**



4º Configurar el MultiTimeSeries (SAVING)



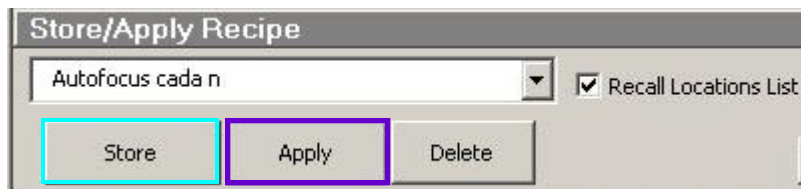
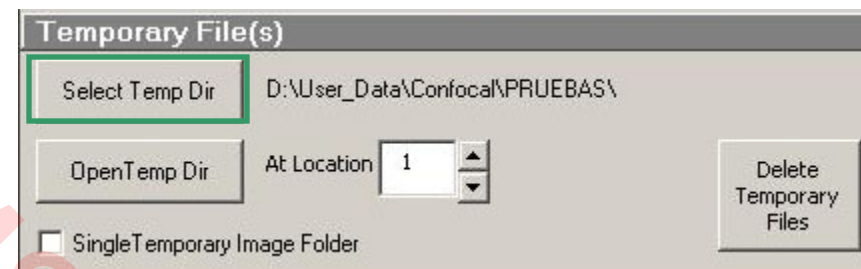
Base File Name: Nombre de la imagen

Select Image Dir: Donde guardar las imágenes finales.

Keep Final Image Open: Dejar la imagen final abierta.

Save Final Image: Guarda los resultados finales en **Select Image Dir**

Select Temp Dir: Directorio para las imágenes temporales.



NOTA: Las configuraciones se guardan en la cuenta de usuario donde se creen.

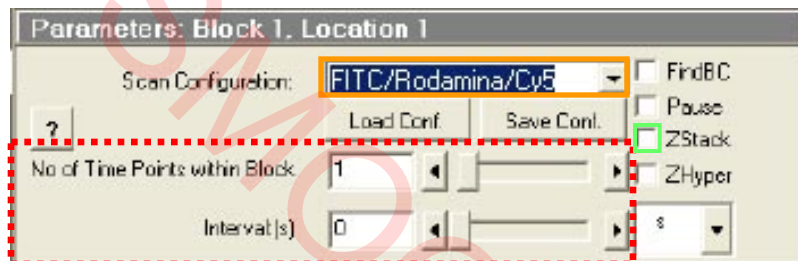
Store: Guarda el método (incluye los 'settings' para todos los bloques y posiciones)

Apply: Aplica unos 'settings' previamente guardados. Si "**Recall Locations List**" está activado, el programa mostrará la lista de coordenadas en XYZ.

NOTA: El programa muestra las posiciones respecto a un origen (0,0,0).

Debe coincidir con el punto de origen del momento en el que se grabaron las posiciones.

5º Configurar MultiTimeSeries (ACQUISITION)



Scan Configuration: seleccionar el método de adquisición que se grabó en el 2º paso

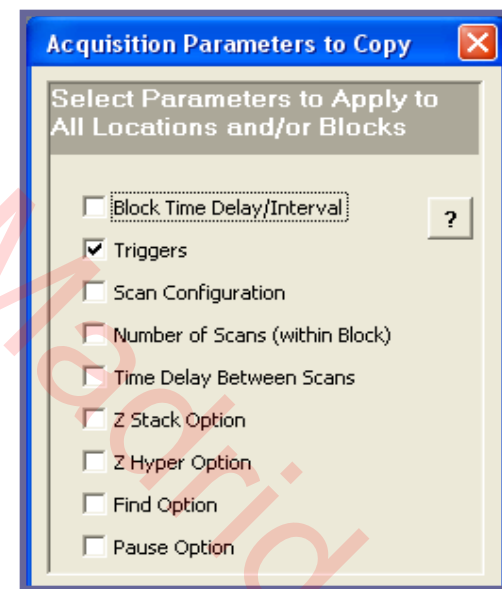
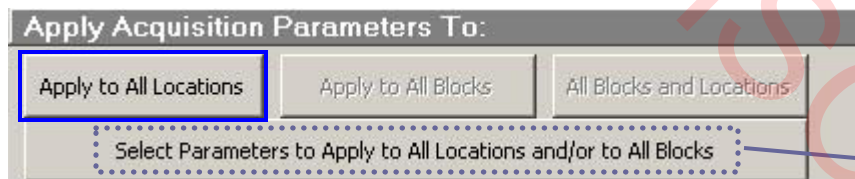
Nº of Time Points within Block: 1

Interval (s): 0

Marcar la casilla de “**ZStack**”, para hacer cortes en Z si se ha configurado el **método seleccionado** para ello.

No trabajar nunca con estos valores si se tienen varias posiciones, porque haría todo el bloque para la posición 1 y una vez terminado seguiría con la siguiente posición.

Siempre mantener el “No of Time Points...” en 1, si ponemos 0 no tomará ninguna imagen.



Primero seleccionar que parámetros han de aplicarse a todas las posiciones. Las opciones que no se marquen podrán configurarse por independientes en las diferentes posiciones

Apply to All Locations: Si se quieren las mismas condiciones para todas las posiciones de platina

6º Configurar MultiTimeSeries (TIMING)



Experiment Repetitions: Número de repeticiones o ciclos.

Group Repetitions: repeticiones de grupo.

Wait Interval: (min) tiempo entre una adquisición y la siguiente.

7º Configurar MultiTimeSeries (BLOCKS)



Seleccionar siempre,

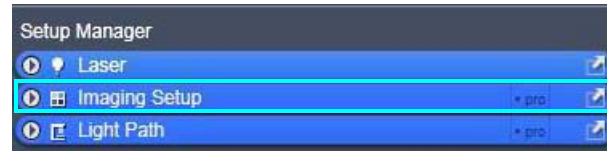
Single Block at Each Location and then Next Block

Edit Location List									
<div>Remove Location Insert Location Add Location Clear All</div>									
	BlkNo	Groups	G.Rep	BlkIntv	ZStack	AutoF	Bleach	Scans	Intvl
List of Blocks	1	1	1	0	No	No	Yes	7	1
List of Locations	1: X=5456.92 Y=5893.87 Z=-14.91								

Asegúrate de que sólo hay **un bloque**

Adquisición “Fitc/Rodam/Cy5/Trans”, o cualquier otro método con la transmisión cada 3 tiempos

1º Configurar el método que vamos a usar

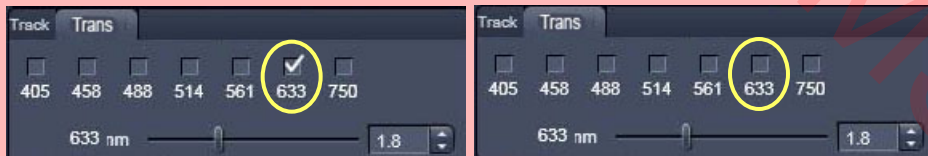


2º **Grabar** el método con la configuración seleccionada.

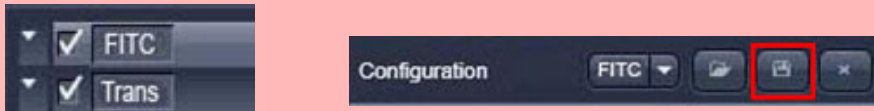
Método con un solo canal + Transmisión

1º Configurar el método “Fitc/Trans”. Guardarlo.

2º **Deseleccionar** el láser del canal “Trans”



3º Guardar el método como “Fitc”



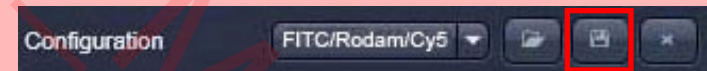
Método mínimo 2 canales + Transmisión

1º Configurar el método “Fitc/Rodam/Cy5/Trans”. Guardarlo.

2º **Deseleccionar** el canal “Trans”



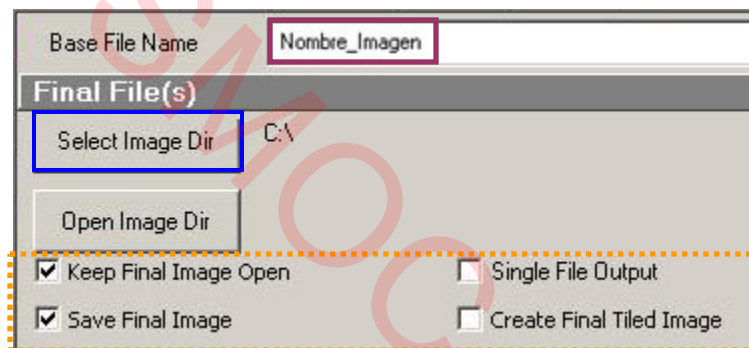
3º Guardar el método como “Fitc/Rodam/Cy5”



3º Cargar el MultiTime Series del menú **Macro**



4º Configurar el MultiTimeSeries (SAVING)



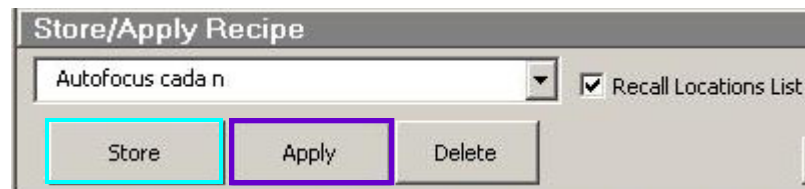
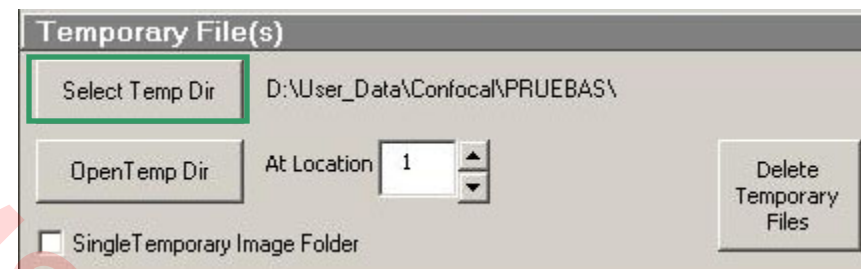
Base File Name: Nombre de la imagen

Select Image Dir: Donde guardar las imágenes finales.

Keep Final Image Open: Dejar la imagen final abierta.

Save Final Image: Guarda los resultados finales en **Select Image Dir**

Select Temp Dir: Directorio para las imágenes temporales.



NOTA: Las configuraciones se guardan en la cuenta de usuario donde se creen.

Store: Guarda el método (incluye los 'settings' para todos los bloques y posiciones)

Apply: Aplica unos 'settings' previamente guardados. Si **"Recall Locations List"** está activado, el programa mostrará la lista de coordenadas en XYZ.

NOTA: El programa muestra las posiciones respecto a un origen (0,0,0).

Debe coincidir con el punto de origen del momento en el que se grabaron las posiciones.

5º Configurar el MultiTimeSeries (BLOCKS)

BlkNo	Groups	G.Rep.	BlkIntv	ZStack	AutoF	Bleach	Scans	Intvl
1	1	1	600	Yes	Yes	No	1	0

List of Locations: 1: X=8400.00 Y=-1700.00 Z=0.00 G1(8x12):1,1

Seleccionar de la **lista de bloques** el bloque **1 (BlkNo)**

Configurar el 1º Grupo

Parameters: Block 1. Location 1

Scan Configuration: FITC/Rodamina/Cy5

No of Time Points within Block: 1

Interval (s): 0

☒ ZStack

☐ ZHyper

☐ FindBC

☐ Pause

Scan Configuration: Seleccionar el método FITC/Rodamina/Cy5/Trans o FITC/Trans, guardado en el 2º paso

Nº of Time Points within Block: 1

Interval (s): 0

Marcar la casilla de “**ZStack**”, para hacer cortes en Z si se ha configurado el **método seleccionado** para ello.

No trabajar nunca con estos valores si se tienen varias posiciones, porque haría todo el bloque para la posición 1 y una vez terminado seguiría con la siguiente posición. Siempre mantener el “No of Time Points...” en 1, si ponemos 0 no tomará ninguna imagen.

Apply Acquisition Parameters To:

Apply to All Locations

Apply to All Blocks

All Blocks and Locations

Select Parameters to Apply to All Locations and/or to All Blocks

Primero seleccionar que parámetros han de aplicarse a todas las posiciones. Las opciones que no se marquen podrán configurarse por independientes en las diferentes posiciones

Apply to All Locations: Si se quieren las mismas condiciones para todas las posiciones de platina

Acquisition Parameters to Copy

Select Parameters to Apply to All Locations and/or Blocks

☒ Block Time Delay/Interval

☒ Triggers

☐ Scan Configuration

☐ Number of Scans (within Block)

☐ Time Delay Between Scans

☐ Z Stack Option

☐ Z Hyper Option

☐ Find Option

☐ Pause Option

Configurar el 1º Grupo

1

MultiTimeSeries (TIMING)

Experiment Repetitions: Número de repeticiones o ciclos del experimento. Aplica tanto al primer grupo como al segundo. Considerándolos un solo bloque

Group Repetitions: 1

Wait Interval: (min) tiempo entre una adquisición y la siguiente.

Debería ser el mismo tiempo que en el grupo2

MultiTimeSeries (LOCATION)

Current Location: Solo una posición de platina

Multiple Location: Varias posiciones de platina

MarkedZ Middle Of the Z Stack considera la **coordenada Z** como la posición central al tomar planos, aunque se haya configurado en el método el Zstack con otro plano como "Center". Si no hemos añadido posiciones, el plano central será la posición actual del eje Z.

Remove Location: Eliminar la posición que aparezca en **List of Locations**

Insert Location: Añadir una posición.

Add Location: Añadir una posición

Clear All: Eliminar todas las posiciones

BlkNo	Groups	G.Rep.	BkIntv	ZStack	AutoF	Bleach	Scans	Intvl
1	1	1	0	No	No	Yes	7	1

List of Locations: 1: X=5456.92 Y=5893.87 Z=-14.91

Crear el 2º Grupo

2

Add Block: añadir un nuevo bloque para la adquisición de FTC/Rodamina/Cy5 o FITC

Buttons: Add Block, Insert Block, Remove Block, Start Group, End Group, ?

Options:

- Single Block at Each Location and then Next Block
- The Whole Group of Blocks at Each Location and Then Next Location
- The Group of Blocks Repeated Number of Group Repetitions at Each Location

Seleccionar siempre,

Single Block at Each Location and then Next Block

Configurar el 2º Grupo

2

BlkNo	Groups	G.Rep.	BkIntv	ZStack	AutoF	Bleach	Scans	Intvl
2	2	2	600	Yes	Yes	No	1	0

List of Locations: 1: X=8400.00 Y=-1700.00 Z=0.00 G1(8x12):1,1

Seleccionar de la **lista de bloques** el bloque **2. (BlkNo)**

Configurar el 2º Grupo

2

MultiTimeSeries (ACQUISITION)



Start

Saving

Acquisition

Timing

Location

Tile

Grid

Z List

Autofocus

Bleach

Blocks

Options

Parameters: Block 1, Location 1

Scan Configuration: FITC/Rodamina/Cy5

No of Time Points within Block: 1

Interval (s): 0

FindBC ☐ Pause ☐ ZStack ☒ ZHyper ☐

Scan Configuration: Seleccionar el método FITC/Rodamina/Cy5, guardado en el 2º paso

Nº of Time Points within Block: 1

Interval (s): 0

Marcar la casilla de “ZStack”, para hacer cortes en Z si se ha configurado el método seleccionado para ello

No trabajar nunca con estos valores si se tienen varias posiciones, porque haría todo el bloque para la posición 1 y una vez terminado seguiría con la siguiente posición.

Siempre mantener el “No of Time Points...” en 1, si ponemos 0 no tomará ninguna imagen.

Apply Acquisition Parameters To:

Apply to All Locations ☒ Apply to All Blocks ☐ All Blocks and Locations ☐

Select Parameters to Apply to All Locations and/or to All Blocks

Primero seleccionar que parámetros han de aplicarse a todas las posiciones. Las opciones que no se marquen podrán configurarse por independientes en las diferentes posiciones

Apply to All Locations: Si se quieren las mismas condiciones para todas las posiciones de platina

Acquisition Parameters to Copy

Select Parameters to Apply to All Locations and/or Blocks

☐ Block Time Delay/Interval

☒ Triggers

☐ Scan Configuration

☐ Number of Scans (within Block)

☐ Time Delay Between Scans

☐ Z Stack Option

☐ Z Hyper Option

☐ Find Option

☐ Pause Option

Configurar el 2º Grupo

2



Start

Saving

Acquisition

Timing

Location

Tile

Grid

Z List

Autofocus

Bleach

Blocks

Options

Wait Interval Wait Delay ?

Experiment Repetitions 3

Experiment Timing : Block 1, Location 1

Group Repetitions: 2

Wait Interval Before Block at First Location Only 0

Apply Wait Before Each Location ☐

Experiment Repetitions: Número de repeticiones o ciclos del experimento. Aplica tanto al primer grupo como al segundo.

Considerándolos un solo bloque

1 + 2

Group Repetitions: 2.

Nº de veces que se quieran tomar las condiciones "Fitc/Rodamina/Cy5" o "FITC" SIN transmisión.

Wait Interval: (min) tiempo entre una adquisición y la siguiente. Debería ser el mismo tiempo que en el grupo1

El resultado:

1ª Rep. Experimento	Grupo1	"Fitc/Rodamina/Cy5/Transmisión"	Tiempo 0 min
	Grupo2 (1ª rep)	"Fitc/Rodamina/Cy5"	Tiempo 5 min
	Grupo2 (2ª rep)	"Fitc/Rodamina/Cy5"	Tiempo 10 min
2ª Rep. Experimento	Grupo1	"Fitc/Rodamina/Cy5/Transmisión"	Tiempo 15 min
	Grupo2 (1ª rep)	"Fitc/Rodamina/Cy5"	Tiempo 20 min
	Grupo2 (2ª rep)	"Fitc/Rodamina/Cy5"	Tiempo 25 min
3ª Rep. Experimento	Grupo1	"Fitc/Rodamina/Cy5/Transmisión"	Tiempo 30 min
	Grupo2 (1ª rep)	"Fitc/Rodamina/Cy5"	Tiempo 35 min
	Grupo2 (2ª rep)	"Fitc/Rodamina/Cy5"	Tiempo 40 min
4ª Rep. Experimento	Grupo1	"Fitc/Rodamina/Cy5/Transmisión"	Tiempo 45 min
	Grupo2 (1ª rep)	"Fitc/Rodamina/Cy5"	Tiempo 50 min
	Grupo2 (2ª rep)	"Fitc/Rodamina/Cy5"	Tiempo 55 min
5ª Rep. Experimento	Grupo1	"Fitc/Rodamina/Cy5/Transmisión"	Tiempo 60 min
	Grupo2 (1ª rep)	"Fitc/Rodamina/Cy5"	Tiempo 65 min
	Grupo2 (2ª rep)	"Fitc/Rodamina/Cy5"	Tiempo 70 min

VARIAS POSICIONES DE PLATINA



Start

Saving

Acquisition

Timing

Location

Tile

Grid

Z List

Autofocus

Bleach

Blocks

Options



Start

Saving

Acquisition

Timing

Location

Tile

Grid

Z List

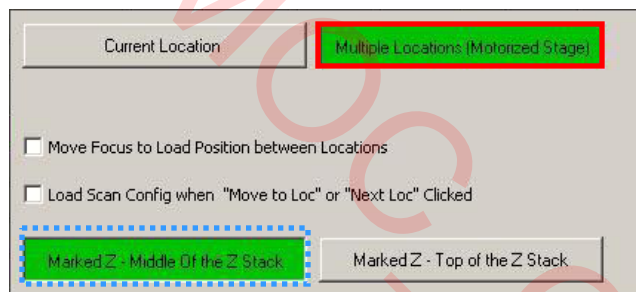
Autofocus

Bleach

Blocks

Options

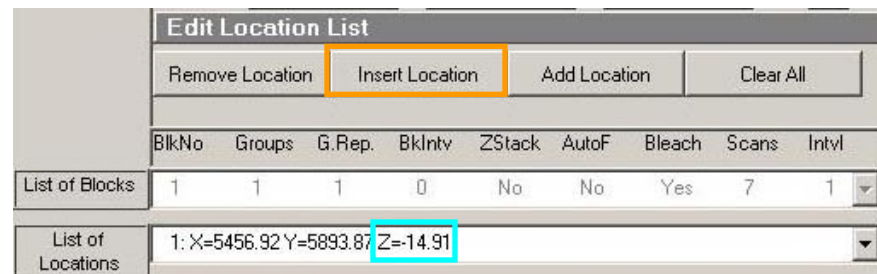
1º Seleccionar **Multiple Locations** (Motorized Stage)



MarkedZ Middle Of the Z Stack considera la **coordenada Z** como la posición central al tomar planos, aunque se haya configurado en el método el Zstack con otro plano como "Center". Si no hemos añadido posiciones, el plano central será la posición actual del eje Z.

2º Mover a la posición seleccionada y presionar **Insert Location**

Para añadir más posiciones, repetir el paso 2.

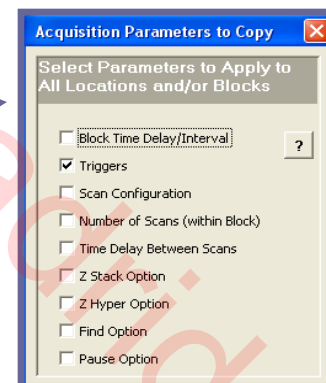


3º Para mantener las mismas condiciones de adquisición en las diferentes posiciones:



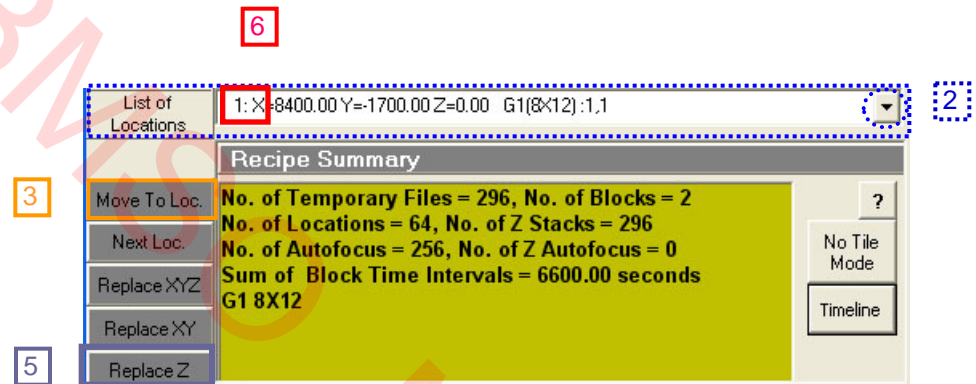
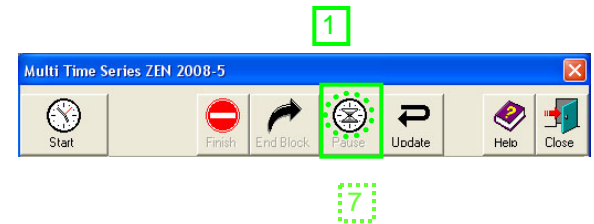
1º Seleccionar que parámetros han de aplicarse a todas las posiciones. Las opciones que no se marquen podrán configurarse por independientes en las diferentes posiciones

2º Seleccionar **Apply to All Locations**



VARIAS POSICIONES DE PLATINA (MODIFICAR EL ENFOQUE)

- 1 Presionar Pausa
 - 2 Seleccionar la posición a modificar.
 - 3 Mover a la posición seleccionada
 - 4 Visualizar con Fast los cambios de plano hasta elegir el nuevo plano enfocado
 - 5 Modificar la nueva coordenada
- Repetir para todas las posiciones que haga falta del punto 2 al 5
- 6 Mover a la posición 1
 - 7 Presionar Resume



NOTA: No olvidar los pasos 6 y 7. Antes de continuar tiene que estar en la posición 1.

OTRAS APLICACIONES



Start

Saving

Acquisition

Timing

Location

Tile

Grid

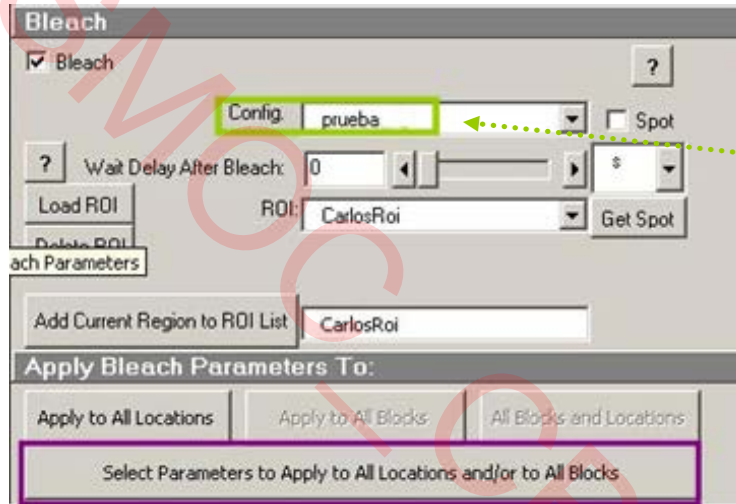
Z List

Autofocus

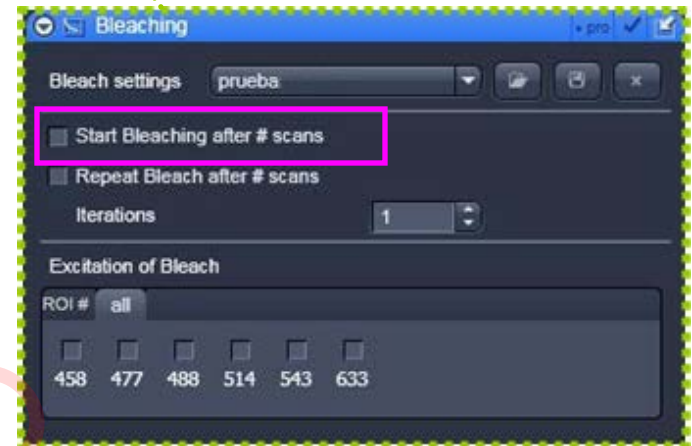
Bleach

Blocks

Options



Configuración Bleaching, guardada en el método.

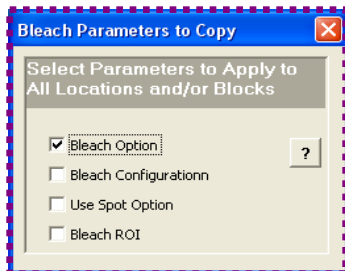


Configuración del Bleaching:

Start Bleaching after # scans: número de imágenes antes del bleaching.

Si no se selecciona, por defecto al hacer el bleaching lo marca y hace 1 imagen antes del bleaching, con lo que es necesario que en "Acquisition" haya al menos 2 adquisiciones, una antes del bleach y otra después.

NOTA: asegurarse que en el número de adquisiciones hay un número mayor que el seleccionado en "Start Bleaching after # scans"



Select Parameters to Apply Locations and/or to All Blocks: seleccionar los parámetros que se quieren aplicar a todas las pociones.

Las opciones que no se marquen podrán configurarse por independientes en las diferentes posiciones.



Start

Saving

Acquisition

Timing

Location

Tile

Grid

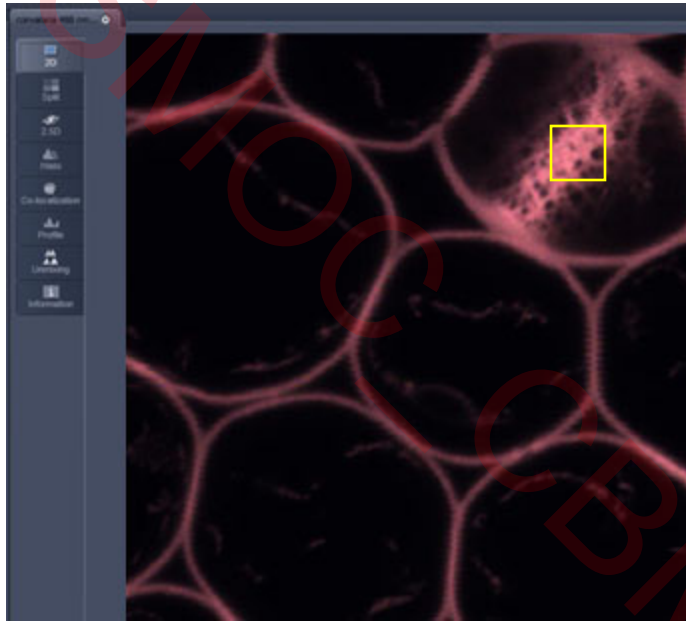
Z List

Autofocus

Bleach

Blocks

Options



Para seleccionar la Roi,

1º Pintar la Roi sobre la imagen con las herramientas de Overlay

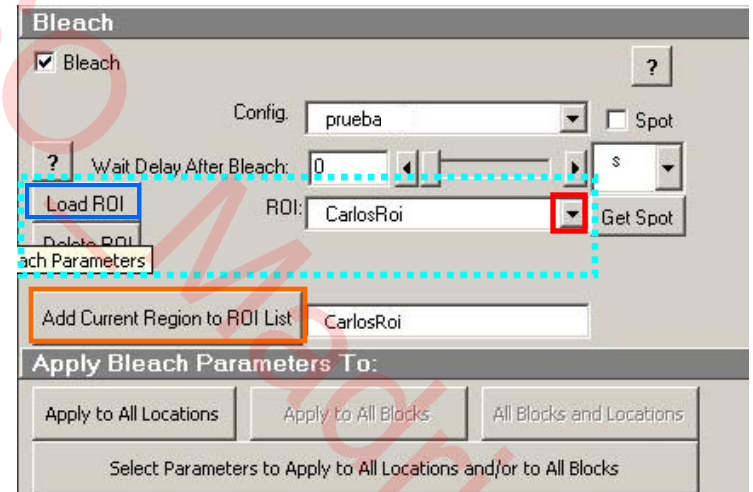
2º Nombrar la región y seleccionar "Add Current Regions to ROI List."

Se pueden añadir varias Rois, usando nombres diferentes.

Para visualizarlas:

Seleccionar la región.

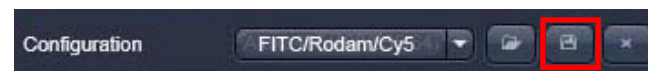
"Load ROI"



1º Configurar el método que vamos a usar



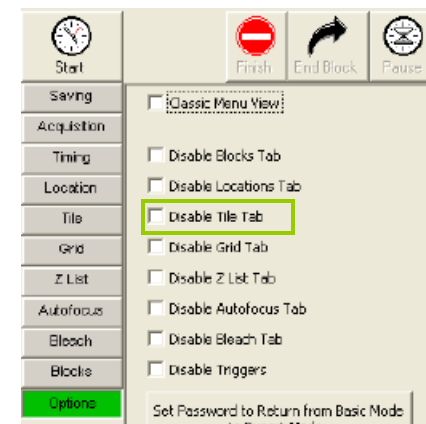
2º **Grabar** el método con la configuración seleccionada.



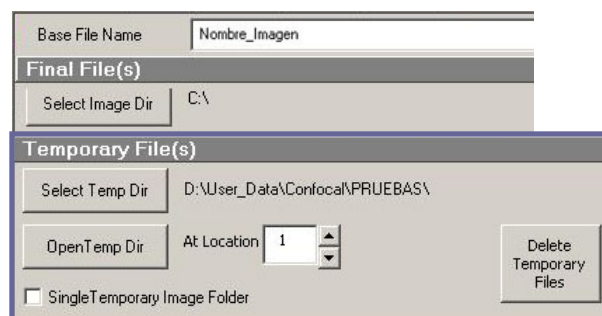
3º Cargar el MultiTime Series del menú **Macro**



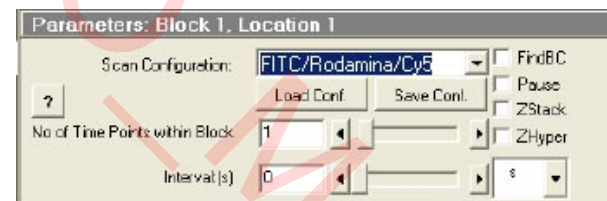
4º Asegurarse que no está seleccionado “Disable Tile Tab”



5º Configurar donde guardar las imágenes. En este caso las imágenes más importantes son las **imágenes temporales**, para poder hacer posteriormente un “Stitch” si la composición que hace el ZEN no queda bien o tiene un tamaño demasiado grande.



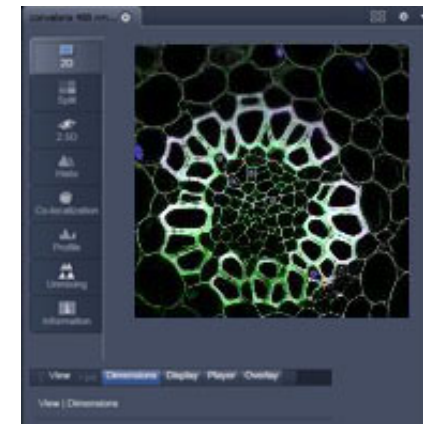
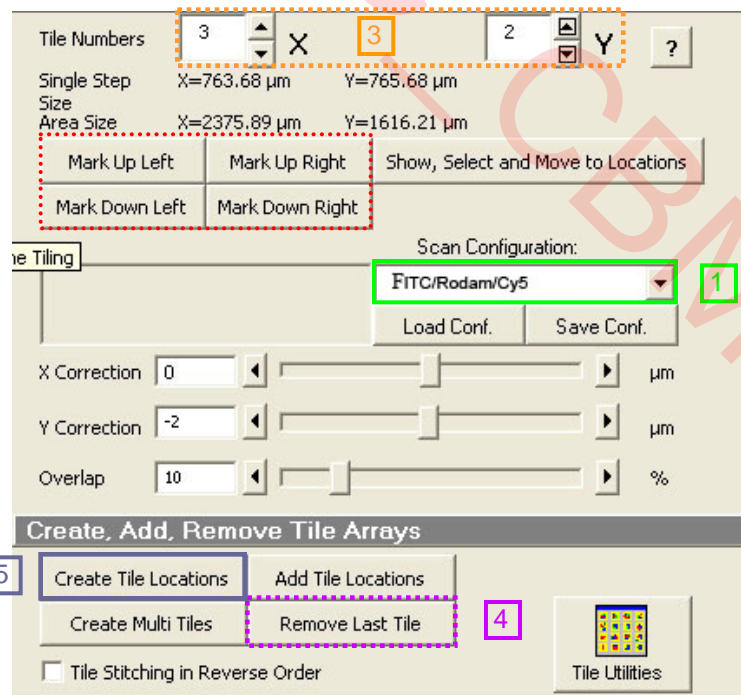
6º Seleccionar el método.



7º Asegurarse de que sólo se repite el experimento **1 vez**, a no ser que se quiera hacer el TileScan varias veces sobre la misma zona



- 1 Seleccionar el método para el Tile
- 2 Colocar la posición actual en el centro de la zona a escanear.
- 3 Seleccionar número de columna y filas.
- 4 Eliminar el anterior TileScan
- 5 Crear el nuevo TileScan.



2



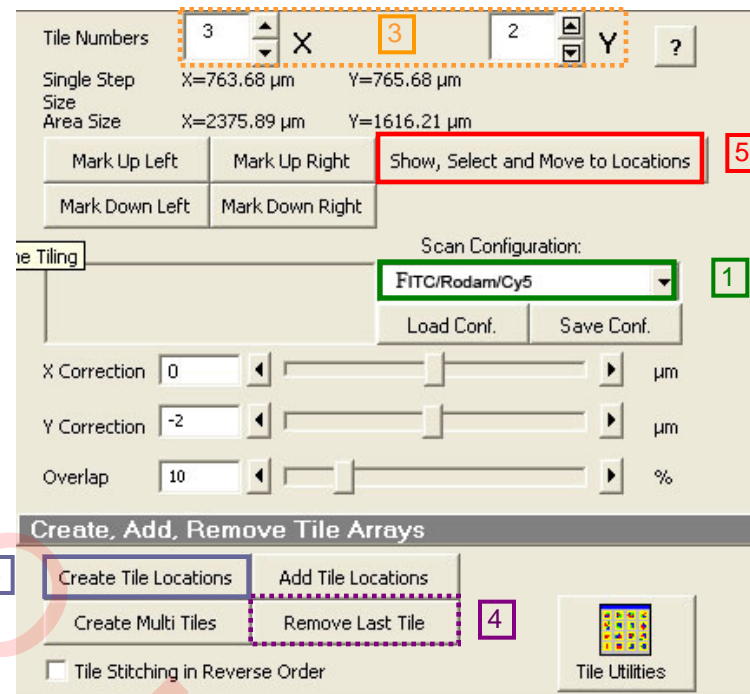
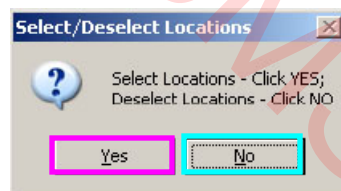
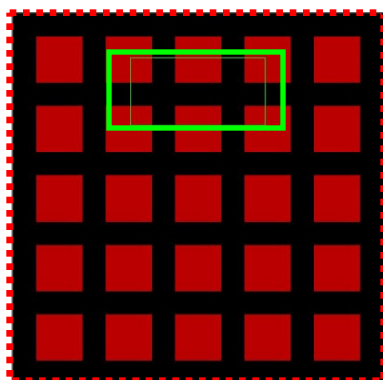
Por ahora no funcionan, trabajar siempre teniendo en cuenta que la posición actual (x,y) se considerará el centro del TileScan

Para hacer **CORTES** con TileScan:

Hacer el 5 en último lugar

Cuando no se sabe el número de columnas y filas que aproximadamente se deberían hacer, se puede intentar con este otro sistema.

- 1 Seleccionar el método para el Tile
- 2 Colocar la posición actual en el centro de la zona a escanear.
- 3 Seleccionar un número de columna y filas bastante amplio
- 4 Eliminar el anterior TileScan
- 5 Seleccionar "Show, Select and Move to Locations"



Para seleccionar que posiciones queremos que tenga nuestro TileScan:

- Pinchar con el botón derecho en la posición, automáticamente la platina se desplazará a esa posición

NO queremos esa posición. **Seleccionar la posición o posiciones y seleccionar NO**

SI queremos esa posición. **Seleccionar la posición o posiciones y seleccionar YES**

- Cuando ya estén todas los cuadros seleccionados. Reajustar el tamaño del Tile.

- 6 Crear el nuevo TileScan.

2 formas de realizar un TileScan:

1. Botón “Show, Select and Move to Locations” INACTIVO:

La posición que dejemos en la platina será el centro del Tile que vamos a adquirir. Debemos definir el **tamaño de la cuadrícula** .

1

2. Botón “Show, Select and Move to Locations” ACTIVO:

Permite memorizar las “**esquinas**” del Tile. Dependiendo de la cantidad de muestra que establezcamos en estas “esquinas”, el programa modificará automáticamente el tamaño de la cuadrícula. Ejemplo:

-Activamos el botón “**Show, Select and Move to Locations**” .

-Con un FasXY nos colocamos en uno de los extremos de la parte de muestra que queremos adquirir.

-Hacemos clic en alguno de los botones que marcan las “**esquinas**” del Tile, por ejemplo,

Mark Up Left.

-Al hacer clic en ese botón aparecerá una cuadrícula con el tamaño provisional del Tile.

Con el botón derecho del ratón marcamos la posición que queremos que ocupe la Imagen que acabamos de escanear. Hacer clic en **Yes** y el programa guardará esa parte de la muestra como el extremo superior izquierdo.

-Repetimos el proceso con las otras 3 “**esquinas**”: nos desplazamos, hacemos clic en los **botones** y seleccionamos lugar en la cuadrícula provisional.

A medida que vayamos guardando estas posiciones, el tamaño de la cuadrícula se adaptará automáticamente.

-Finalmente hacer clic en “**Create Tile Locations**” y en “Start”.

